

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
(Direktoren: Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn,
Prof. Dr. H. G. Lasch)

**Das Verhalten
der alkalischen Leukocytenphosphatase des
Kaninchens unter dem Einfluß von
Actinomycin D und Puromycin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jochen Weber
aus Weilburg

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
(Direktoren: Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn,
Prof. Dr. H. G. Lasch)

**Das Verhalten
der alkalischen Leukocytenphosphatase des
Kaninchens unter dem Einfluß von
Actinomycin D und Puromycin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jochen Weber
aus Weilburg

Gießen 1970



Dekan: Professor Dr. med. E. Habermann
Referent: Priv. Doz. Dr. med. H. Löffler
Korreferent: Professor Dr. med. J. Kracht

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PROBLEMSTELLUNG	5
3. MATERIAL UND METHODEN	6
3.1. Material	6
3.2. Leukozytenkonzentratgewinnung	6
3.3. Die Gewinnung der alkalischen Leukocyten- Phosphatase	8
3.4. Biochemische Bestimmung der alkalischen Leukocytenphosphatase	9
3.5. Stärkegelelektrophorese	9
3.6. Zytochemischer Nachweis der alkalischen Leukocytenphosphatase-Aktivität	13
3.7. Versuchsablauf	14
3.8. Mathematische Berechnungsmethoden (Statistik)	15
4. ERGEBNISSE	17
4.1. Zytochemische Bestimmung der alkalischen Leukocytenphosphatase	17
4.1.1. Kontrolltiere	17
4.1.2. Actinomycintiere	18
4.1.3. Puromycintiere	21
4.2. Stärkegelelektrophorese	24
4.2.1. Kontrolltiere	24
4.2.2. Actinomycintiere	25
4.2.3. Puromycintiere	26
4.3. Signifikanzberechnung	27
4.3.1. Das Verhalten der alkalischen Leukocyten- phosphatase nach Actinomycin	27
4.3.2. Das Verhalten der alkalischen Leukocyten- phosphatase nach Puromycin	29
4.3.3. Zellen der Reaktionsklasse 0	31
5. DISKUSSION	33
5.1. Das Verhalten der alkalischen Leukocyten- phosphatase nach Actinomycin und Puromycin	33
5.2. Das Verhalten der alkalischen Leukocyten- phosphatase bei der Stärkegelelektrophorese	37

6.	ZUSAMMENFASSUNG	39
7.	TABELLENANHANG	41
7.1.	Kontrolltiere	42
7.2.	Actinomycintiere	43
7.3.	Puromycintiere	44
8.	LITERATURVERZEICHNIS	45

1. EINLEITUNG

In der klinischen Routinediagnostik hat der Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität in den neutrophilen Granulocyten bei der Differentialdiagnose verschiedener hämatologischer Krankheitsbilder seinen festen Platz. WACHSTEIN berichtete bereits 1946 über die verminderte oder fehlende Phosphataseaktivität bei chronisch-myeloischer Leukämie.

Bei verschiedenen Erkrankungen findet man folgende Veränderungen der alkalischen Leukocytenphosphataseaktivität (aLP-Aktivität):

a.) fehlende oder erniedrigte Aktivität:

regelmäßig bei: Unbehandelter chronisch-myeloischer Leukämie, frühkindlicher A-Phosphatasie, paroxysmaler nächtlicher Hämoglobulinurie.

gelegentlich: Eisenmangelanämien, sideroachrestischen Anämien, hämolytischen Anämien, rheumatische und virusbedingte Erkrankungen, Morbus WERLHOF, Erythroleukämie, einzelnen Fällen von Osteomyelose.

b.) normale Aktivität: Unkomplizierte symptomatische Polyglobulie, vereinzelt bei chronisch-myeloischen Leukämien in Remission oder bei gleichzeitig bestehender Gravidität.

c.) erhöhte Aktivität in der Regel bei: Osteomyelosklerose, Polycythaemia vera, Thrombocythämie, akuter Leukämie, Lymphogranulomatose, bakterielle Infektionen, Sepsis, und Gewebeeinschmelzungen, Stress-Situationen jeglicher Art, Schwangerschaft, Komata, bei vielen Tumoren.

Der Aktivitätsindex der aLP zeigt beim Mann nur geringe Veränderungen, welche den Normalbereich nicht überschreiten. Bei der Frau beobachtet man signifikante Veränderungen des aLP-Index während des menstruellen Zyklus (BAUER-SIC u. a.). Das bei der Frau nachgewiesene Aktivitätsmaximum fällt zeitlich etwa mit der Ovulation zusammen. Ebenso treten auch charakteristische Veränderungen während der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett auf (HAERING 1964). Als Schwangerschaftstest erscheint die Bestimmung der aLP-Aktivität nicht geeignet, da es durch unspezifische Faktoren leicht zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

aLP ist mit cytochemischen Methoden in den reifen neutrophilen Granulocyten (Stab- und Segmentkernigen) des Menschen nachweisbar, nicht dagegen in den eosinophilen Granulocyten, Myeloblasten, Monocyten, Plasmazellen und Lymphocyten (ALEKSANDROWICZ, GAERTNER, URBANCZYK, MERKER). In letzter Zeit wurde allerdings mit veränderter Methodik alkalische Phosphataseaktivität in einzelnen lymphoiden Zellen festgestellt (KAPLOW).

Die Bildung der aLP beginnt nach den bisherigen Vorstellungen (PLENERT) auf der Stufe des Promyelocyten bis Myelocyten. Die Enzymausstattung wird im Knochen-

mark abgeschlossen. Die cytochemisch nachweisbare aLP-Aktivität der reifen Granulocyten ist im Knochenmark niedriger als im peripheren Blut (TRUBOWITZ, LAMBERS).

Die zum Teil kurzfristig einsetzenden Aktivitätsschwankungen im peripheren Blut sollen sich folgendermaßen erklären lassen: Ein Anstieg der aLP erfolgt durch die Abgabe von enzymaktiven Granulocyten aus Depots in das periphere Blut, eine Enzymabnahme kommt durch eine Abwanderung von enzymaktiven Zellen aus der Blutbahn zustande.

Die Beeinflussung der Enzymaktivität durch Zusatz bestimmter Substanzen bei in-vitro-Versuchen und die Veränderungen während des menstruellen Zyklus lassen aber auch die Frage zu, ob nicht noch andere Faktoren in die Regulation der Enzymaktivität eingreifen. So zeigte ANTONIOLI, daß neben den humoralen und endokrinen Faktoren (Nebennierenrinde und Ovar) auch eine Acidose einen Einfluß auf die Aktivität hat. Der aLP-Index soll auch durch weitere bisher nicht exakt definierte Plasmafaktoren beeinflußt werden (WEISEL u. LOHMANN).

TRUBOWITZ und Mitarb. 1962, ALTER u. Mitarb. 1963 fanden eine Erhöhung der aLP-Aktivität bei Mongoloiden. Bei diesen Menschen liegt eine Trisomie 21 vor, ebenso besteht eine Neigung zu Infektionen (STEWART 1961). Da bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie ebenfalls eine Veränderung des Chromosoms 21 in Form des Philadelphia-Chromosoms (Ph 1) besteht, und die aLP erniedrigt ist oder fehlt, wurde vermutet, daß die alkalische

Leukocytenphosphatase von einem Gen auf dem Chromosom 21 gelenkt wird. Eine eindeutige Beziehung konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (ROSEN u. TEPLITZ 1965).

2. PROBLEMSTELLUNG

Es liegen zahlreiche Untersuchungen über das Verhalten der aLP bei den verschiedenen Krankheiten und unter Stressbedingungen vor. Die Stimulierung der aLP wurde experimentell untersucht. Bisher existieren jedoch keine Untersuchungen über die Hemmbarkeit der aLP mit Inhibitoren der RNS- und Proteinsynthese. Die nachfolgende Arbeit soll einen Beitrag dazu liefern. Dabei sollte die Frage berücksichtigt werden, ob eine Änderung der Enzymaktivität mit elektrophoretisch erfaßbaren qualitativen Veränderungen einhergeht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material:

Es wurden Leukocyten von weiblichen Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2000 g untersucht.

Verabfolgt wurden die Antibiotica Actinomycin D und Puromycin der Firma Serva, Heidelberg. Während Actinomycin D eine selektive Hemmung der RNS-Synthese durch Blockierung der RNS-Polymerase bewirkt, also eine Wirkung auf die Nucleinsäuresynthese zeigt, hemmt Puromycin die Proteinsynthese. Durch Strukturähnlichkeit von Puromycin mit dem 3'terminalen Ende der Aminoacyl-Transfer RNS kommt es zum Einbau von Puromycin in den Polymerisationsprozess. Dies aber führt zu einer Beendigung der Proteinsynthese, d. h. eine halbfertige, inaktive Pep-tikette⁴ löst sich vom Ribosom ab.

CONNEY u. GILMAN (1963), GELBOIN u. BLACKBURN (1964), DELLWEG (1966), JOHN u. MILLER (1966), GOODMAN (1967), MAIUNDAR, TSUKADA u. LIEBERMANN (1967), OENLERT u. KLIETMANN (1967), GROLLMANN (1967/68), HILL (1968), BOTTE u. KOIDE (1968), SCHIEBLER u. PILGRIM (1968), DENKHAUS u. MÜLLER (1969), YOUNG (1969).

3.2. Leukocytenkonzentratgewinnung:

Die 2000 g schweren weiblichen Tiere wurden mit 0,7 bis 1,0 ml pro kg Körpergewicht Nembutal (Pantobabital-Natrium 50 mg/ml, Abbot) i.v., in einer Verdünnung von 1:1 mit Ringerlösung, narkotisiert (VESTHUES u. FRITZSCH 1961).

Zur Gewinnung der Leukocytenkonzentrate für die Elektrophorese bekamen die Kaninchen über die rechte V. jugularis ext. einen Katheter in den rechten Herzvorhof gelegt: Ein 2 bis 3 cm langer Schnitt eröffnete die rechte Halssäite, nachdem diese Stelle vorher geschoren und mit Sepsotinktur eingerieben worden war. Nach Freipräparation der rechten V. jugularis ext. wurde der Katheter eingeführt. Zum Schutz vor einer eventuellen Beschädigung durch das Kaninchen wurde er subcutan bis an die Basis des rechten Kaninchenohres verlegt, wo das freie Katheterende aus einem kleinen Hautschnitt wieder an die Oberfläche geführt wurde. Die Halswunde wurde mit Reverinpuder bestreut, um etwaigen Infektionen vorzubeugen. Danach wurde die Haut mit einer Zwirnnahrt verschlossen. Die Narkosedauer betrug 1 bis 2 Stunden. Nachdem der intracardiale Katheter gelegt war, erfolgte eine Entnahme von 10 ml Blut in ein Röhrchen mit etwas Liquemin zur Verhinderung der Gerinnung. Gleichzeitig wurden zwei Blutaustriebe für die zytochemische Untersuchung angefertigt.

Das Blut wurde 5 Minuten bei ca. 3000 U/min. zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Serumüberstandes kam die oberste Sedimentschicht (mit einem sichtbaren Konzentrat an weißen Blutzellen) in ein neues Zentrifugierglas. 1 Vol. dieses Konzentrates wurde mit 4 Vol. 0,83 %iger NH_4Cl versetzt und gemischt, um den Restbestand an Erythrocyten zu entfernen (AGOSTONI u. IDEO 1964). Nach kurzer Einwirkzeit wurde

abermals zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte eine erneute NH_4Cl -Zugabe zum Sediment. Anschließend wurde wieder gemischt und zentrifugiert. Nach 4- bis 5maliger Wiederholung dieses Vorganges befanden sich keine Erythrocyten mehr im Sediment und der Überstand erschien durchsichtig und klar. Ein zweimaliges Waschen des Leukocytensedimentes mit physiologischer NaCl -Lösung beendete diesen Arbeitsgang.

3.3. aLP-Gewinnung: Anreicherung (in Anlehnung an (TRUBOWITZ):

Das Leukocytenkonzentrat wurde in 1 ml physiologischer NaCl -Lösung suspendiert, in einen Homogenisator nach Potter - Elvehjem mit Motorantrieb gegeben und homogenisiert. Der Homogenisator befand sich dabei in einem mit Eis gefüllten Glas, um eine Erwärmung mit Denaturierung der aLP bei diesem Vorgang zu verhindern. Aus dem gleichen Grund wurde nach jeweils 10 sec. Homogenisieren eine kurze Pause eingelegt. Nach ca. 2 min. war der Vorgang des Homogenisierens beendet. Anschließend wurde Butanol (KLEIN u. Mitarb. 1965) zugesetzt und nochmals 1 min. homogenisiert. Das mit Butanol versetzte Leukocytenhomogenat wurde in einer MSE-Zentrifuge (Kühlzentrifuge MSE, High speed 18) bei 18000 U/min. $1/2$ Std. zentrifugiert.

Nach Beendigung dieses Vorganges zeigten sich im Zentrifugenglas drei Fraktionen:

- 1.) die oberste Schicht: klar, Butanol, enthält keine aLP-Aktivität.

2.) Die mittlere Schicht: Klar, enthält
aLP-Aktivität in wässriger Lösung.

3.) Die unterste Schicht: Sediment (Zell-
trümmer).

3.4. Qualitative biochemische aLP-Aktivitätsbestimmung:

Der biochemische Nachweis der aLP-Aktivität in der Proteinklösung (mittlere Schicht) erfolgte nach der Methode von BESSY, LOWRY und BROCK (1962), mit den Reagenzien von Boehringer (Mannheim). (RICHTERICH u. GAUTIER 1962).

In ein Reagenzglas wird 1 ml Puffer pipettiert, mit 0,1 ml Enzymlösung gemischt und genau 30 min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert (Puffer: 0,05 M Glycin-Puffer; pH = 10,5; $0,5 \times 10^{-3}$ M Mg Cl₂; 0,005 M Na-p-nitrophenylphosphat). Anschließend werden 10 ml (0,2 n) NaOH hinzugegeben. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte mit dem Photometer Eppendorf (Firma Netheler und Hinz, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 405 nm in einer Glasküvette von 1 cm Schichtdicke gegen den Leerwert.

3.5. Stärkegelelektrophorese:

Die Auftrennung der alkalischen Leukocytenphosphatase erfolgte hochspannungselektrophoretisch im Stärkegel, modifiziert nach der Methode von SMITHIES (1955).

24_g_Stärke: Starch-Hydolysed for Gel Elektro-
phoresis (G. SMITHIES)
Connaught Medical Res. Laboratoris,
University of Toronto, Toronto, Canada

160 ml Boratpuffer (Kochpuffer): pH = 8,6

Zusammensetzung: 1,86 g Borsäure
(H_3BO_3)

auf 2000 ml Aqua dest. auffüllen.

Als Elektrophoresegerät diente der Pherograph "Original Frankfurt" nach Wieland u. Pfeleiderer der Firma L. Hormuth & Vetter, Wissloch/Baden. Das Gerät ermöglicht in zwei gekühlten Kammern jeweils zwei elektrophoretische Trennungen. Als Elektrodenpuffer wurde folgender Brückenpuffer verwandt:

9,3 g Borsäure (H_3BO_3)

2,4 g NaOH

auf 2000 ml Aqua dest auffüllen

Die Stärke wurde mit dem Boratkochpuffer in einem 500 ml Rundkolben gelöst und unter leichtem Schwenken des Kolbens über der Bunsenbrennerflamme vorsichtig erhitzt, bis die Stärke zähflüssig wurde und homogen erschien. Nach kurzem Sieden wurden die sich hierbei bildenden Luftblasen mit Hilfe des Reitmeyeraufsatzes an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das heiße, flüssige Gel wurde dann in eine mit Paraffinöl eingeriebene Kunststoffschale gegossen. (Gelschale: 30 cm lang, 8 cm breit). Nach dem Erkalten schützteein Abdecken mit Paraffin (Erstarrungspunkt 42°C bis 44°C , E. Merck) die Geloberfläche vor dem Austrocknen. Anschließend kam das Gel dann noch zur "Reifung" für 6 bis 12 Stunden in den Kühlschrank (4°C). Aus einem Gelende wurde dann ein etwa 7 cm breiter Streifen geschnitten. Zwischen die beiden Schnittflächen wurden bis zu drei Filterpapierstreifen eingesetzt, die mit dem phospho-

tasehaltigen Leukocytenextrakt getränkt worden war (s. Abb. 1). Ein erneutes Abdecken der Wandstrecke mit Paraffin sollte ein Austrocknen während der Elektrophorese verhindern.

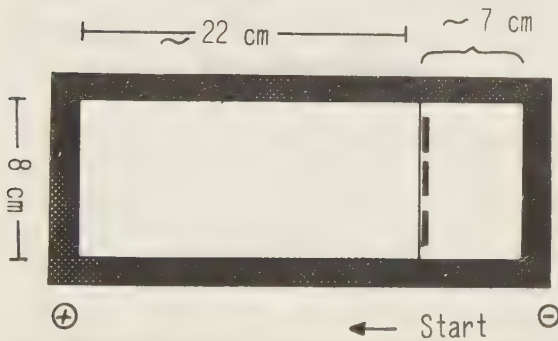


Abb. 1: Gelschale mit Gel, Schnittfläche und drei eingesetzte Filterpapierstreifen.

Die Elektrodenschalen des Elektrophoresegerätes wurden mit Boratbrückenpuffer gefüllt, nachdem die Kühlung des Gerätes auf eine Temperatur von -5°C bis -7°C eingestellt worden war. Die Gelschalen wurden so in die Elektrophorese eingebracht, daß die Filterpapierstreifen kathodennahe lagen.

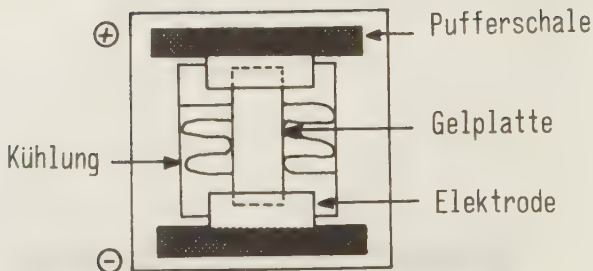


Abb. 2: Elektrophorese

Nach ca. 4 Stunden waren die Komponenten der aLP deutlich von einander getrennt. Die Gelplatten wurden nach Beendigung der Elektrophorese sofort mit einem Messer horizontal in der Hälfte auseinander geschnitten und gefärbt.

Färbung:

Die einzelnen Komponenten der aLP wurden mit Na-alpha-Naphthylphosphat als Substrat und Variaminblausalz B als Kupplungssalz nachgewiesen. Die auseinandergeschnittenen Gelplatten wurden in folgender Lösung inkubiert:

50 ml 0,1 m Tris HCl-Puffer pH = 9,0

15 mg Na-alpha-Naphthylphosphat

30 mg $MgSO_4$

30 mg Variaminblausalz B (in 1 ml Äthylenglykol gelöst)

Anschließend wurde das Substrat/Puffergemisch filtriert. Nach 12 Stunden war die Inkubation beendet und die Gelplatten wurden in Aqua dest. ausgewaschen. Sie wurden danach in einer aufsteigenden Glycerinlösung entwässert und in reiner Glycerinlösung aufbewahrt. Die Extinktionen der einzelnen Komponenten, die in Form von Banden sichtbar wurden, wurden photometrisch im "Vitatron"-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.6. Zytochemische aLP-Aktivitätsbestimmung:

Die zytochemische Bestimmung der aLP-Aktivität wurde mit der Azofarbstofftechnik in der Modifikation von MERKER u. HEILMYER durchgeführt:

- a.) Lufttrockene Blutaussstriche (nicht älter als 3 Tage) 30 sec. bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einem Gemisch von 90 Teilen Methanol und 10 Teilen Formalin (37 %ig) fixieren, unter fließendem Wasser abspülen und trocknen.
- b.) Inkubation 1 Stunde bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis $+5^{\circ}\text{C}$ in folgender Substratmischung, die jeweils frisch angesetzt wird:
 - 70 ml 2 %iges Veronalnatrium pH = 9,4
 - 35 mg Na-alpha-Naphthylphosphat
 - 70 mg Variaminblausalz B conc.

Vor dem Mischen mit dem gelösten Substrat empfiehlt es sich, das im Puffer vorgelöste Diazoniumsalz zu filtrieren. Anschließend unter fließendem Wasser spülen und lufttrocknen.

c.) Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun (Merok)
8 bis 10 Minuten. Abspülen, lufttrocknen.

b.) Einschluß in Glyceringelatine oder Gelatinol und Auswertung mit der Immersionsoptik.

Die Auswertung erfolgt in der von BRODELL u. SWISHER sowie KAPLOW angegebenen Weise:

100 neutrophile Stab- und Segmentkernige werden aufeinanderfolgend gezählt und nach der Stärke ihrer Reaktion dem 0-5-System zugeordnet. Die Summe der auf die einzelnen Reaktionsklassen entfallenden Zellen, vervielfacht mit dem jeweiligen Klassenfaktor, ergibt die Aktivitätszahl oder den aLP-Index.

z. Beispiel

<u>Reaktionsklasse</u>	<u>Prozent</u>	<u>Multiplik.Faktor</u>	<u>Phosphat. Aktivität</u>
0	18	0	0
1	25	1	25
2	32	2	64
3	17	3	51
4	3	4	12
5	0	5	0
Phosphataseindex			152

3.7. Versuchsablauf:

Am Tag nach dem Legen des Katheters und der ersten Blutentnahme bekamen die Kaninchen in einer ein-

maligen Gabe:

a.) Actinomycin D: 100 ug/kg Körpergewicht
(250 ug Actinomycin D/ml phys.
NaCl)

bzw. b.) Puromycin: 35 mg/kg Körpergewicht
(20 mg Puromycin/ml phys. NaCl)

i.v. injiziert. Jeden Tag erfolgte eine Katheterspülung und es wurden zwei Blutaussstriche zu zytochemischen Beobachtungen des aLP-Index angefertigt. Sobald sich in der täglichen Verlaufskontrolle zytochemisch der niedrigste Wert der aLP-Aktivitätszahl erkennen ließ, wurde den Tieren zum zweiten Mal 10 ml Blut entnommen, um den Einfluß der Antibiotika auf die beiden Fraktionen der elektrophoretisch aufzutrennenden aLP zu beobachten.

3.8. Mathematische Berechnungsmethoden (Statistik):

Zur Bestimmung einer Signifikanz und der Standardabweichung der Versuchsergebnisse wurde wegen des kleinen Kollektivs an Versuchstieren die Methode nach STUDENT vorgezogen (KREYSZIG 1967). Somit errechnet sich die Standardabweichung nach folgender Gleichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} (S(x)^2 - \bar{x} S(x))}$$

wobei $\bar{x}$ = den Mittelwert

$S(x)$ = die Summe der Einzelwerte

$S(x)^2$ = die Summe der Einzelwertquadrate

n = die Anzahl der Versuche angibt.

Die Signifikanzberechnung ergab* nach der Gleichung:

$$S = \sqrt{\frac{S(x_1)^2 - \frac{S}{N_1}(x_1)^2 + S(x_2)^2 - \frac{S}{N_2}(x_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

wobei S = Standardabweichung

$\bar{x}_1$ = Mittelwert der Versuchsgruppe

$\bar{x}_2$ = Mittelwert der Kontrollgruppe

N_1 = Anzahl der Versuchstiere

N_2 = Anzahl der Kontrolltiere ist.

Die Signifikanz ergab sich aus der Abweichung:

a.) Unterschiede der Kontrolltiere/Versuchstiere:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S} \sqrt{\frac{N_1 \times N_2}{N_1 + N_2}}$$

b.) Die Unterschiede Ausgangswert/entsprechenden Versuchswerten:

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d} \sqrt{N}$$

$\bar{d}$ = Mittelwert der Differenzen: Ausgangswert/best. Versuchswert

S_d = Standardabweichung der Differenzen

N = Anzahl der Versuchstiere

*sich

4. ERGEBNISSE

4.1. Zytochemische aLP-Aktivitätsbestimmung:

4.1.1. Kontrolltiere

Um einen Hinweis auf die Streubreite der Normalwerte zu erhalten, wurde an gesunden Tieren ein Jugulariskatheter gelegt. Am 1. und 9. Tag der Verlaufskontrolle erfolgte eine Entnahme von 10 ml Blut. Zytochemisch wurde der Phosphataseindex täglich bestimmt. Es ergab sich für die Normalwerte der alkalischen Leukocytenphosphatase folgender Verlauf:

Tab. 1 aLP Aktivitätszahl (Kontrolle)

Kontrolltiere : n = 2

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
$\bar{x}$	201	193	197	190	197	200	192	187	192	191	193
a	± 19	± 5	± 8	± 14	± 8	± 1	± 3	± 4	± 12	± 12	± 6

Eine Wirkung der beiden Inhibitoren zeigt sich wahrscheinlich nicht nur in der Änderung des aLP-Index, sondern möglicherweise auch in der Abnahme der Zahl der Zellen mit starker Reaktion. Besonders deutlich müsste sich ein Effekt auf die Zahl der Zellen mit der Reaktionsklasse 0 (Zellen ohne aLP-Aktivität) auswirken. In der

Tabelle 2 sind die Zellzahlen der Reaktionsklasse 0 bei den Kontrollen wiedergegeben. Es ergibt sich über einen Zeitraum von 10 Tagen keine statistisch zu sichernde Differenz der verschiedenen Werte.

Tab. 2 : Zellen der Reaktionsklasse 0 (Kontrolle)

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
$\bar{x}$	7,5	6	6	7	7,5	6,5	7	7	7,5	7	6
a	$\pm 7,7$	$\pm 4,2$	$\pm 4,9$	± 7	$\pm 8,5$	$\pm 2,1$	$\pm 4,9$	$\pm 5,7$	$\pm 4,2$	$\pm 5,7$	$\pm 2,8$

4.1.2. Actinomycintiere:

In der Versuchsgruppe I bekamen 11 Kaninchen eine einmalige Gabe von 100 ug Actinomycin D pro kg Körpergewicht injiziert. Die Tabelle 3 zeigt, daß die Aktivitätszahl bis zum 4. Tag praktisch gleich blieb, um dann nach ständiger Abnahme am 10. Tag ein Minimum zu erreichen. Vom 11. Tag an stieg die Aktivitätszahl wieder an.

Tab. 3 : aLP Aktivitätszahl (Aktinomycin)

Versuchstiere : n = 11

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag
$\bar{x}$	207	198	217	199	203	183	159	132	125	117	115	157
a	± 49	± 60	± 28	± 49	± 44	± 53	± 30	± 23	± 31	± 30	± 25	± 14

Die Zellen der Reaktionsklasse 0 nahmen nach dem 4. Tag sprunghaft zu, um am 7. und 8. Tag den siebenfachen Wert der Ausgangszahl zu erreichen (Tab. 4).

Tab. 4 : Zellen der Reaktionsklasse 0 (Aktinomycin)

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
$\bar{x}$	3	7	2	3	4	13	17	21	21	18	19
a								+22,4	+17,7	+ 21,6	+9,9

Die Abbildung 3 stellt das Verhalten der aLP-Indices und der Zellzahl der Reaktionsklasse 0, nach der Injektion von Actinomycin D, im Verlauf von 12 Tagen dar. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die beiden Kurven spiegelbildlich verhalten.

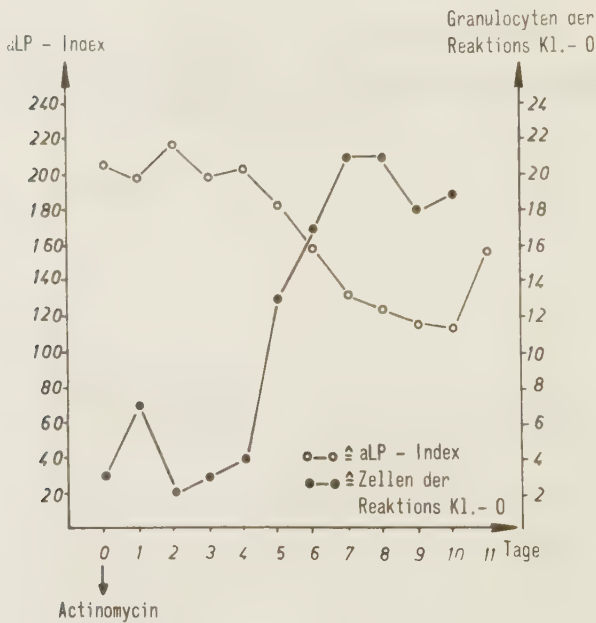


Abb. 3: Das Verhalten der aLP-Aktivitätszahl und der Zellen der Reaktionsklasse 0 nach einer Injektion von Actinomycin D.

4.1.3. Puromycintiere:

In der Versuchsgruppe II bekamen 10 Kaninchen eine einmalige Gabe von 35 mg Puromycin pro kg Körpergewicht injiziert. Der aLP-Index fiel, ähnlich wie auch nach der Actinomycin D-Gabe, nach dem 5. Tag langsam ab, bis am 10. Tag ein Minimum erreicht wurde. Danach stieg die Aktivitätszahl wieder an (Tab. 5).

Tab.5 : aLP Aktivitätszahl (Puromycin) Versuchstiere : n = 10

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag
$\bar{x}$	180	179	183	179	170	159	134	122	105	102	97	115
a	$\pm 22,5$	$\pm 26,5$	± 29	± 30	± 37	± 45	± 40	± 45	± 40	$\pm 31,5$	± 29	± 15

Bei der Reaktionsklasse 0 trat nach dem 3. Tag der Puromycingabe eine Erhöhung der Zellzahl auf, die am 9. Tag nach der Injektion ihr Maximum mit einer vierfachen Erhöhung des Ausgangswertes hatte. Anschließend fiel der Anteil der Zellen mit der Reaktionsklasse 0 wieder langsam ab. (Tab. 6).

Tab.6 : Zellen der Reaktionsklasse 0 (Puromycin)

	0.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag
$\bar{x}$	7	7	8	9	13	13	15	23	26	27	25	19
a	$\pm 2,7$	$\pm 7,5$	$\pm 6,8$	$\pm 8,1$	$\pm 13,1$	$\pm 17,4$	$\pm 18,6$	$\pm 27,2$	$\pm 51,2$	± 48	$\pm 22,3$	$\pm 12,5$

Ähnlich wie bei Actinomycin D zeigen die Kurven der aLP-Aktivitätszahl und der Leukocyten der Reaktionsklasse 0 nach Puromycingabe einen etwa spiegelbildlichen Verlauf (Abb. 4).

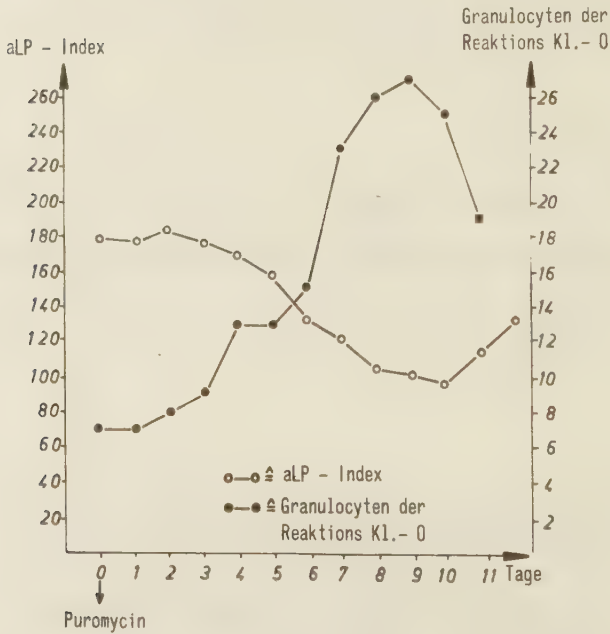


Abb. 4: Das Verhalten der aLP-Aktivitätszahl und der Zellen der Reaktionsklasse 0 nach Puromycininjektion.

Bei der Betrachtung der Einzelwerte in den beiden Versuchsgruppen (siehe Tabellenanhang) fällt auf, daß das Aktivitätsminimum der aLP bei den 21 Tieren sich auf den Zeitraum vom 7. bis 10. Tag nach der Injektion der Antibiotica verteilt. Die Abbildung 5 veranschaulicht, daß am 7. Tag 3 Tiere ihr Minimum erreichen, am 8. und 9. Tag sind es 13 Tiere. 5 Tiere zeigen erst am 10. Tag ihren niedrigsten Wert.

Anzahl der Tiere

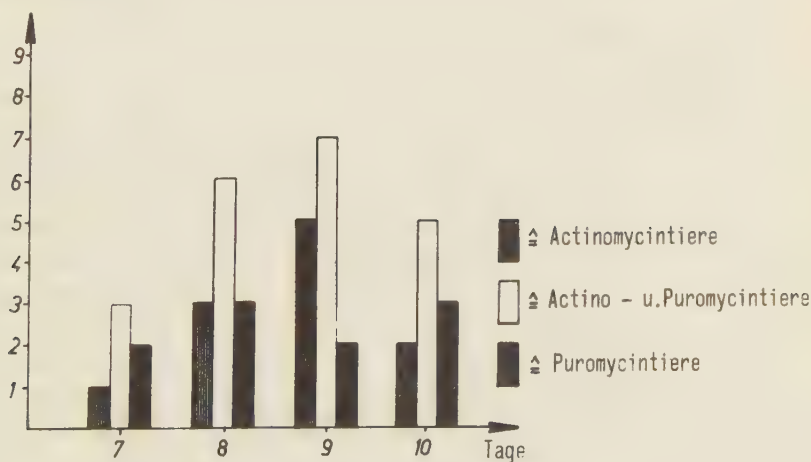


Abb. 5: Das zeitliche Auftreten der aLP-Indexminima bei den Versuchstieren nach Actinomycin D-bzw. Puromycingabe.

4.2. Stärkegelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der alkalischen Leukocytenphosphatase in Stärkengel sollte zeigen, ob die Antibiotica Actinomycin D und Puromycin die Synthese der beiden normalen Komponenten der aLP verschieden stark hemmen.

Die Einteilung der Komponenten geschah nach der Empfehlung des "Subcomittes on Isoenzymes" der "International Union of Biochemistry" (1964), wobei die am schnellsten wandernde Komponente, d. h. die am weitesten anodenwärts wandernde Komponente mit I, und die nahe der Auftragsstelle befindliche Fraktion mit II bezeichnet wurde.

4.2.1. Kontrolltiere:

Normale Leukocyten: Aus 21 verschiedenen Konzentrationen normaler Leukocyten wurden zwei unterschiedlich schnell anodisch wandernde Fraktionen mit Phosphataseaktivität erfaßt: Die schneller anodisch wandernde Bande I besitzt eine erheblich stärkere Phosphataseaktivität, als die an der Auftragsstelle befindliche Komponente II. Bei zwei Konzentrationen normaler Leukocyten fehlte die Bande I, und die Enzymaktivität der Bande II war ebenfalls etwas erniedrigt.

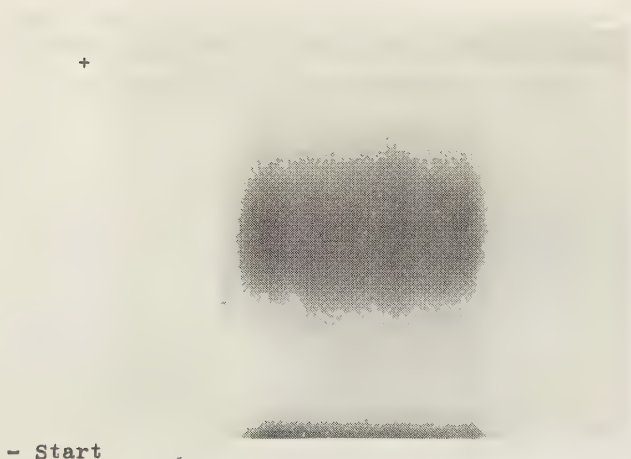


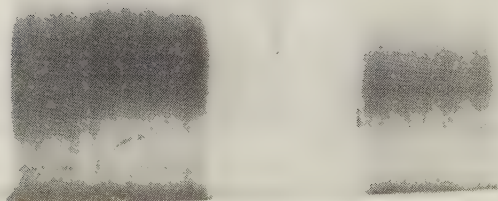
Abb. 6: Elektrophoretische Trennung von aLP
(normale Leukocyten).

4.2.2. Actinomycintiere:

Nach einer einmaligen Gabe von Actinomycin D wurde durch zytochemische Untersuchungen der niedrigste Wert der aLP-Aktivitätszahl in der täglichen Verlaufskontrolle abgewartet, dann wurde ein Leukocytenkonzentrat hergestellt. Bei 11 Kaninchen zeigte sich zwischen dem 7. bis 10. Tag nach der Actinomycininjektion folgende elektrophoretische Auftrennung der aLP: Es wurden bei 10 verschiedenen Leukozytenkonzentraten immer die Banden I und II gefunden. Beide Banden wiesen aber eine schwächere Enzymaktivität auf als bei normalen Leukocyten. Die Komponente I besaß aber immer noch eine stärkere Phosphataseaktivität als die Komponente II. Ein Tier, bei dem nur die Komponente II

beobachtet wurde, zeigte auch nach Actinomycingabe nur diese Bande, aber mit etwas weniger Enzymaktivität.

+ .



Start- .

Abb. 7: Elektrophoretische Trennung
(Actinomycin).

4.2.3. Puromycintiere:

Die Wirkung von Puromycin auf die aLP zeigte sich nach elektrophoretischer Auftrennung im Stärkegel an folgenden Änderungen: Bei 7 Tieren kam es zu einem ausgeprägten Enzymaktivitätsverlust der Bande I, während die Phosphataseaktivität der Bande II sich kaum verringerte, d. h. nach Puromycingabe besaß die Bande II eine relativ stärkere Aktivität als die Komponente I. Bei 3 Kaninchen, die vor der Behandlung Komponente I mit einem Enzymaktivitätsmaximum

gegenüber Bande II zeigten, stellte sich nach Puromycingabe nur noch die Bande II dar, während die Komponente I völlig fehlte.

Start-



+

Abb.:8: Elektrophoretische Trennung
(Puromycin)

4.3. Signifikanzberechnung

4.3.1. aLP-Werte nach Actinomycin:

Für die Berechnung der Standardabweichung und der Signifikanz wurde die Methode von STUDENT benutzt. Es ergaben sich statistisch gesicherte Unterschiede für die Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase, sowohl zwischen den Unterschieden vom Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Actinomycingabe, als auch zwischen den aLP-Werten von Kontrolltieren und Actinomycin-tieren:

Tab. 7 : Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren (AKTINOMYCIN)

	n	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	
Kontr.	2	187 $\pm$ 4	192 $\pm$ 12	191 $\pm$ 12	193 $\pm$ 6	aLP Index
Actin.	11	132 $\pm$ 32	125 $\pm$ 31	117 $\pm$ 30	115 $\pm$ 25	aLP Index
p		0,005	0,01	0,0025	0,0025	

Tab.7: Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontroll- und Actinomycintieren.

Tab. 8 : Unterschiede der Aktivitätszahl der aLP zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Actinomycingabe.

	0.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
n	11	9	7	10	5
aLP Index	207 $\pm$ 49	132 $\pm$ 23	125 $\pm$ 31	117 $\pm$ 30	115 $\pm$ 25
p		0,0025	0,0025	0,0005	0,0125

Tab. 8: Unterschiede der Aktivitätszahl der aLP zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Actinomycingabe.

4.3.2. aLP-Werte nach Puromycin:

Bei der Versuchsserie von Tieren, die mit Puromycin behandelt waren, ließen sich ebenfalls signifikante Unterschiede der aLP-Werte feststellen:

Tab.9 : Signifikanz der Unterschiede zwischen K o n t r o l l - und Versuchstieren .

(PUROMYCIN)						
	n	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	
Kontrolle	2	187 ± 4	192 ± 12	191 ± 12	193± 6	aLP Index
Puromycin	10	132 ± 45	105 ± 40	102 ± 31	97 ± 29	aLP Index
p		0,05	0,01	0,0025	0,0025	

Tab. 9: Signifikanz der Unterschiede zwischen
Kontroll- und Versuchstieren. (Puromycin)

Tab. 10 : Unterschiede der Aktivitätszahl der aLP zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Puromycingabe.

	<u>0.Tag</u>	<u>7.Tag</u>	<u>8.Tag</u>	<u>9.Tag</u>	<u>10.Tag</u>	<u>11.Tag</u>
n	10	10	10	9	6	3
aLP Index	180 $\pm$ 22	122 $\pm$ 45	105 $\pm$ 40	102 $\pm$ 31,5	97 $\pm$ 29	115 $\pm$ 15
p		0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0125

Tab. 10: Unterschiede der Aktivitätszahl der aLP zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Puromycingabe.

4.3.3. Zellen der Reaktionsklasse 0:

Auch bei den Granulocyten ohne aLP-Aktivität (Zellen der Reaktionsklasse 0) ergaben sich statistisch gesicherte Unterschiede zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Antibioticagabe:

Tab.11 : Unterschiede der Zellzahl der Granulocyten (Kl.0) zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Actinomycingabe.

	0.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag
n	7	6	6	5	6
Granulocyten (Kl.0)	3 ± 0	17 ± 7,7	21 ± 9,2	21 ± 8,5	18 ± 6,9
p		0,01	0,0025	0,0025	0,0025

Tab. 11: Unterschiede der Zellzahl der Granulocyten (Kl. 0) zwischen Ausgangswert vor und bestimmten Zeitpunkten nach Actinomycingabe.

Tab. 12 : Unterschiede der Zellzahl der Granulocyten (Kl.0) zwischen Ausgangswert vor und bestimmt
Zeitpunkten nach Puromycingabe.

	0.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
n	10	10	10	10	9	6
Granulocyten	7	15	23	26	27	25
(Kl.0)						
p		0,01	0,0005	0,0005	0,0005	0,01

Tab. 12: Unterschiede zwischen Ausgangswert
vor und bestimmten Zeitpunkten nach
Puromycingabe.

5. DISKUSSION

5.1 aLP-Verhalten nach Actinomycin:

Bei den vorgelegten Untersuchungen wurden mit zytochemischer Methodik bei 22 Kaninchen als Normalwerte Aktivitätszahlen (Indices) zwischen 140 und 240 ermittelt, die Werte von 18 Kaninchen lagen zwischen 170 und 210. Verlaufskontrollen bei unbehandelten Tieren über 10 Tage ließen keine statistisch zu sichernde Differenz der einzelnen Werte erkennen, so daß die Beeinflussung der experimentellen Ergebnisse durch spontane Schwankungen ausgeschlossen werden kann.

Nach einmaliger Injektion von 100 ug Actinomycin D pro kg Körpergewicht wurde am 10. Tag nach Injektion der niedrigste Wert mit einem Index von 115 erreicht, die Granulocyten ohne Phosphataseaktivität (Kl. 0) stiegen gegenüber dem Ausgangswert auf das Siebenfache an. Trägt man die Werte in ein Koordinatensystem ein, so verhalten sich die beiden Kurven für Aktivitätszahlen und Zellen der Klasse 0 spiegelbildlich.

Nach einmaliger Injektion von 35 mg Puromycin/kg Körpergewicht ergaben sich fast identische Verhältnisse: Nach langsamem Abfall vom 5. Tag nach Injektion wurde die niedrigste Aktivitätszahl am 10. Tag mit 97, und der höchste Anteil von Zellen der Klasse 0 mit dem Vierfachen des Ausgangswertes am 9. Tag erreicht. Die beiden Kurven verhielten sich auch nach Puromycin annähernd spiegelbildlich. Nach der Injektion der beiden Antibiotica wird das Aktivitätsminimum bei Be-

rücksichtigung der einzelnen Tiere zwischen dem 7. und 10. Tag erreicht. Diese Ergebnisse lassen sich mittels STUDENT-Test statistisch sichern.

Zum Verständnis der beschriebenen Ergebnisse muß zunächst kurz auf die Kinetik der Granulocytopoese und den Ort der alkalischen Leukocytenphosphatasebildung eingegangen werden. Der Wirkungsmechanismus der beiden Inhibitoren wurde eingangs bereits kurz beschrieben.

Nach ALKER u. Mitarb. beträgt die Lebensdauer der reifen Granulocyten beim Kaninchen 2-4 Tage. Innerhalb der Granulocytopoese ist die Proteinsynthese als Voraussetzung jeglicher Enzymsynthese mit der starken Abnahme der Zytoplasma-RNS bereits im Myelocytenstadium nahezu vollständig abgeschlossen (THORELL 1947). Die Ausreifung von Myelocyten bis zum reifen segmentkernigen Granulocyten beträgt etwa 4 Tage (BOLL).

Alkalische Phosphatase ist in den spezifischen (sekundären) Granula der neutrophilen Granulocyten des Menschen und in den analogen heterophilen Granula der Kaninchen-Granulocyten lokalisiert. Diese spezifischen (sekundären) Granula werden zuerst vereinzelt in Promyelocyten beobachtet, sie bilden in den reifen Granulocyten die Hauptmasse der Zytoplasmagranula (SPICER und HARDIN). Mit zytochemischen Methoden gelingt der Nachweis von alkalischer Leukocytenphosphataseaktivität in den unreifen Vorstufen

nicht, sie wird frühestens in vereinzelt Metamyelocyten erkennbar. Die Aktivitätsstärke nimmt*fortschreitender Reifung zum Segmentkernigen zu. Übereinstimmend mit der Zunahme der alkalischen Leukocytenphosphataseaktivität, in Parallele mit der Reifung, findet man im Knochenmark zytochemisch und biochemisch niedrigere alkalische Phosphataseaktivität als im peripheren Blut (TRUBOWITZ; LAMERS).

Aus den Untersuchungen über den Ablauf der Proteinsynthese in Säugerzellen wissen wir, daß die Information für die Proteinsynthese nur während der aktiven Proliferation der unreifen Zellen stattfindet. Diese korreliert mit den morphologisch und zytochemisch nachweisbaren Indizien, nämlich dem Nachweis von Nucleolen im Kern und dem Vorhandensein von RNS im Zytoplasma. Aus allen diesen Befunden können wir entnehmen, daß eine wesentliche Enzymsynthese vom Myelocyten- oder Metamyelocytenstadium an nicht mehr möglich ist.

Wir haben gesehen, daß die Phosphataseaktivität, gemessen am ermittelten Index, vom 4. bis 5. Tag nach Injektion der beiden Inhibitoren langsam abnimmt, um zwischen dem 7. bis 10. Tag ein Maximum zu erreichen. Vom selben Zeitpunkt an nimmt auch die Zahl der Zellen ohne zytochemisch nachweisbare Phosphataseaktivität zu. Dieser beginnende Aktivitätsverlust nach 4 bis 5 Tagen entspricht etwa der Lebensdauer jener Granulocyten, bei denen zytochemisch Phosphataseaktivität nachgewiesen werden kann. Danach werden zunehmend Zellen in die Peripherie eingeschwemmt,

*mit

deren unreife Vorstufen durch Actinomycin oder Puromycin beeinflusst werden, bei denen also Transkription oder Translation gestört werden, so daß eine Hemmung der Phosphatase-synthese resultierte. Die Vorstufen jener Zellen, die in den ersten 4 Tagen nach Injektion ausgeschwemmt wurden, waren vor der Antibiotica-injektion angelegt worden, bei ihnen blieb die Proteinsynthese unbeeinflusst. Zu ähnlichen Überlegungen kam MÜLLER nach Analyse des Effektes von einem alkylierenden Cytostaticum auf die Aktivität der aLP beim Menschen. Aus dem Nebeneinander von beeinflussten und unbeeinflussten reifen Granulocyten erklärt sich das allmähliche Absinken der Enzymaktivität, bzw. die allmähliche Zunahme der Zellen ohne Enzymaktivität vom 4. bzw. 5. bis etwa zum 10. Tag. Danach klingt die Wirkung der einmaligen Injektion ab, die Aktivitätswerte und der Anteil der Zellen ohne Enzymaktivität nähern sich wieder dem Normbereich.

Ein Effekt der beiden Inhibitoren auf das fertige Enzym ist entsprechend dem Wirkungsmechanismus der beiden Substanzen nicht zu erwarten und kann aus dem vorgelegten Untersuchungsergebnis auch nicht abgeleitet werden.

- 5.2. aLP-Verhalten bei der Stärkegelelektrophorese:
Zur Charakterisierung und Unterscheidung der aLP wurde die Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES verwandt. Bei der Untersuchung des menschlichen Serums und verschiedener Organe

ergab sich, daß eine Heterogenität der alkalischen Phosphatase besteht (DIENSTL). LEE u. Mitarb. fanden bei Patienten mit Polycythaemia vera qualitative Unterschiede der aLP gegenüber dem Enzymmuster bei normalen Leukocyten. TRUBOWITZ u. Mitarb. vertreten die Ansicht, daß es sich bei der aLP um ein einheitliches Enzym handelt. Bei der elektrophoretischen Untersuchung mit menschlichen Leukocyten fanden LÖFFLER u. Mitarb. in allen Fällen zwei, in einigen Fällen drei verschieden schnell anodisch wandernde Fraktionen mit aLP-Aktivität.

Bei unserer Untersuchung stellten sich als normales Enzymmuster bei 21 Kaninchen ebenfalls zwei verschieden schnell anodisch wandernde Fraktionen dar, während sich bei 2 Tieren nur eine Bande mit Enzymaktivität zeigte. Die schneller anodisch wandernde Bande I besaß eine stärkere Phosphataseaktivität als die nahe der Auftragsstelle lokalisierte Bande II.

Nach der Applikation von Actinomycin D traten keine Änderungen im Enzymmuster auf, sondern es verringerte sich nur die Phosphataseaktivität beider Banden.

Nach Puromycininjektion nahm nur die Aktivität der Bande I stark ab, so daß sich jetzt das Enzymaktivitätsmaximum an der Auftragsstelle (Bande II) befand. In drei Fällen fehlte sogar die Komponente I, obwohl sie sich noch vor dem Versuchsbeginn als aktivitätsstärkste Fraktion darstellen ließ.

Eine stichhaltige Erklärung für dieses Verhalten scheint nicht möglich. Es ist jedoch denkbar, daß es sich bei der schneller anodisch wandernden Bande I um ein lösliches Enzym handelt, während bei der Bande II das Enzym stärker strukturgebunden und deshalb noch in Verbindung mit anderen Komponenten vorliegt. Damit wäre die geringere Wanderungsgeschwindigkeit im Stärkegel zu erklären. Unklar bleibt jedoch, warum eine unterschiedlich starke Hemmwirkung auf die beiden Banden nur nach Puromycin und nicht auch nach Actinomycin D auftritt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Kaninchen mit Hilfe elektrophoretischer und zytochemischer Methoden der Einfluß des Transkriptionshemmers Actinomycin D und des Translationsinhibitors Puromycin auf die alkalische Leukocytenphosphatase untersucht.

Bei 22 unbehandelten Kontrolltieren lagen die normalen Aktivitätszahlen (Indices) der aLP zwischen 140 und 240. Nach Gabe von Actinomycin D bzw. Puromycin wurde zwischen dem 7. bis 10. Tag nach der Injektion der stärkste aLP-Aktivitätsverlust beobachtet. Gleichzeitig waren die Leukocyten der Reaktionsklasse 0 (Zellen ohne Phosphataseaktivität) auf das Vier- bis Siebenfache ihres Ausgangswertes erhöht.

Der nach 4 bis 5 Tagen beginnende Aktivitätsverlust der aLP entspricht etwa der Lebensdauer jener Granulocyten, bei denen zytochemisch Phosphataseaktivität nachgewiesen werden kann (Myelocyt bis Segmentkerniger). Die Vorstufen jener Zellen, die in den ersten 4 Tagen nach der Injektion ausgeschwemmt werden, waren vor der Inhibitorengabe angelegt, d.h. bei ihnen blieb die Proteinsynthese unbeeinflusst. Danach werden zunehmend Zellen in die Peripherie eingeschwemmt, deren unreife Vorstufen durch Actinomycin D (und) oder Puromycin beeinflusst worden sind. Aus diesem Nebeneinander von beeinflussten und unbeein-

flußten reifen Granulocyten erklärt sich das allmähliche Absinken der Enzymaktivität, bzw. die allmähliche Zunahme der Zellen ohne Phosphataseaktivität vom 4. bzw. 5. bis etwa zum 10. Tag. Danach klingt die Wirkung der einmaligen Injektion ab, die aLP-Aktivitätswerte und der Anteil der Zellen ohne Enzymaktivität nähern sich wieder dem Normbereich.

Die elektrophoretische Auftrennung der aLP im Stärkegel ergab als normales Enzymmuster zwei verschieden schnell anodisch wandernde Banden. Nach der Applikation von Actinomycin D treten keine Änderungen im Enzymmuster auf, sondern es verringert sich nur die Aktivität beider Banden. Dagegen nimmt nach Puromycininjektion besonders die Aktivität der Bande I stark ab, so daß sie sich in einem Drittel der Fälle überhaupt nicht mehr darstellen läßt, obwohl sie noch vor Versuchsbeginn als stärkste Komponente vorhanden war. Dieses Verhalten ließ sich nicht sicher klären.

7. TABELLENANHANG

1. Zahl = aIP-Aktivitätszahl
2. Zahl = Leukocyten der Reaktionsklasse 0

7.1. Kontrolltiere: (n = 2)

0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag
193	189	191	180	203	185	183	194	183	199
11	9	7	10	11	7	10	9	6	8
210	197	203	200	197	199	191	190	200	187
4	3	5	5	2	7	4	6	8	4

,

7.2. Actinomycintiere: (n = 11)

0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag
275	296	268	252	256	245	222	124	-	-	115	143
205	190	-	113	-	-	120	-	-	87	137	-
133	146	-	160	-	133	125	127	92	64	130	164
203	-	215	208	-	161	165	141	120	124	-	153
180	127	201	-	197	-	167	186	-	112	71	-
7	10	1	-	2	-	8	5	-	18	42	-
218	-	-	205	-	265	156	106	39	134	-	-
3	-	-	2	-	11	13	28	29	19	-	-
220	-	235	-	259	-	-	138	-	129	-	180
0	-	1	-	0	-	-	14	-	12	-	8
170	190	192	198	184	178	177	-	157	149	120	160
5	7	1	3	1	11	14	-	9	17	28	20
251	280	194	255	162	-	180	122	122	120	-	142
2	4	4	4	13	-	25	23	26	30	-	22
234	190	237	-	161	125	128	124	175	-	-	-
3	2	2	-	5	19	18	24	20	-	-	-
198	167	196	-	-	174	148	121	115	162	-	-
3	10	2	-	-	10	21	32	23	12	-	-

7.3. Puromycintiere: (n = 10)

o. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag
208 7	223 3	220 1	190 2	161 4	140 2	138 5	123 24	117 23	121 18	150 7	- -
176 3	185 3	185 5	189 6	210 7	202 3	190 6	200 5	189 5	136 19	92 23	123 15
187 2	197 2	195 1	189 1	180 1	164 5	108 2	85 33	103 21	136 19	- -	- -
183 3	181 0	189 1	200 0	209 2	188 0	175 2	123 17	101 37	82 35	62 44	100 39
211 2	210 2	223 4	240 1	224 7	251 2	193 3	211 8	144 13	127 17	101 19	123 18
179 5	179 15	202 7	177 6	165 19	169 22	136 15	102 21	69 36	53 41	99 29	- -
184 10	170 9	176 9	144 20	172 10	120 17	99 20	101 22	87 25	58 48	76 28	- -
138 14	129 19	141 15	147 13	124 22	103 35	81 43	67 44	116 18	- -	- -	- -
168 10	155 8	163 18	155 21	139 27	119 26	108 29	97 31	59 46	105 28	- -	- -
170 12	158 16	131 18	162 17	119 32	136 22	114 26	103 25	65 40	99 21	- -	- -

81 LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) AGOSTONI, A., IDEO, G.:
Seperation of large numbers of lymphocytes
from human blood.
Experientia 21, 82 (1965)
- 2.) ANTONIOLI, J. A., BAER, A., VANNOTTI, A.:
Les phosphatases leucocytaires alcaline et
acide: Variations pathologiques regulation
humorale et rapports avec les phosphatases
plasmatiques.
Acta haematol. 34, 129 (1965)
- 3.) ALEKSANDROWICZ, I., GAERTNER, H., URBANCZYK, J.:
Metabolism of blood cells and their precursors
in E. SZIRMAI: Nuclear Hematology, S. 193
Academic Press, New York and London 1965
- 4.) ALKER, R. I., HEFION, J. C., PALMER, J. G.:
Leukocyte labeling with inorganic radio-
phosphorus.
Amer. J. Physiol. 201, 1137 (1961)
- 5.) ALTER, A.A., LEE, S. L., POURFAR, M.,
DOBKING, G.:
Studies of leukocyte alkaline phosphatase in
monoplism: A possible chromosome marker.
Blood 22, 165 (1963)
- 6.) BAUER-SIC, P.:
Signifikante Veränderung des alkalischen Leuko-
cytenphosphataseindex während des menstruellen
Zyklus.
Acta endocrinologica 52, 130 (1966)
- 7.) BOLL, I.:
Granulocytopoese unter physiologischen und patho-
logischen Bedingungen.
Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik Bd. 17
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
- 8.) BOTTE, V., KOIDE, S. S.:
Effect of actinomycin D on the induction of
uterine alkaline phosphatase of growing rats
by 17-beta-estradiol.
Experientia 24, 1024 (1968)
- 9.) BRODELL, H., SWISHER, S. N.:
Studies of leukocyte alkaline phosphatase deter-
mined by a clinically applicable histochemical
method.
Clin. Res. Proc. 2, 58 (1954)

- 10.) CONNEY, A. H., GILMAN, A. G.:
Puromycin inhibition of enzyme induction by
3-methylcholanthrene and phenobarbital.
J. biol. Chem. 238, 3682 (1963)
- 11.) DELLWEG, H.:
Neuere Aspekte zur Wirkungsweise einiger
Antibiotica.
Dtsch. med. Wschr. 91, 1697 (1966)
- 12.) DENKHAUS, W., MÜLLER, W.:
Über den Einfluß von Actinomycin D auf die
Acridinflouoreszenz von L-Zellen in vitro.
Klin. Wschr. 47, 384 (1969)
- 13.) DIENSTL, F.:
Zur Frage der Heterogenität der alkalischen
Phosphatase.
Wien. Klin. Wschr. 77, 193 (1965)
- 14.) GELBOIN, H. V., BLACKBURN, N. R.:
The stimulatory effect of 3-methylchanthrene
on benmpyrene hydrolase activity in several
rat tissuss; inhibition by actinomycin D and
puromycin.
Cancer Ressarch 24, 356 (1964)
- 15.) GOODMAN, M. H.:
Metabolic effects of actinomycin in rats.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med 126, 821 (1967)
- 16.) GROLLMAN, A. P.:
Inhibitors of protein biosynthesis.
V. Effects of enetine on protein and nucleio
acid biosynthesis - He La Cells.
J. biol. Chem. 243, 4089 (1968)
- 17.) HAERING, M.:
Das Verhalten der alkalischen Leukocytenphos-
phatase in der Schwangerschaft, unter der Ge-
burt und im Wochenbett.
Zschr. f. Geburtshilfe u. Gynäkologie 162, 132 (1964)
- 18.) HILL, R. B.:
Biosynthesis of protein and prothrombin.
J. biol. Chem. 243, 3930 (1968)
- 19.) JOHN, D. W., MILLER, L. L.:
Influence of actinomycin D and puromycin on net
synthesis of plasma albumin and fibrinogen by the
isolated perfused rat liver.
J. biol. Chem. 241, 4817 (1966)

- 20.) KAPLOW, L. S.:
Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase.
Use of complex naphthol AS phosphatase in azo-
dye coupling techniques.
Amer. J. of Clin. Pathol. 39, 439 (1963)
- 21.) KAPLOW, L. S.:
Alkaline phosphatase in peripheral blood lympho-
cytes.
Arch. Path. 88, 69 (1969)
- 22.) KLEIN, U. E., LÖFFLER, H., LEUCKFELD, E.:
Elektrophoretische Trennung von Milchsäure-
dehydrogenase - Isoenzym, unspezifischen
Esterasen und alkalischen Phosphatasen aus
menschlichen Blutzellen.
Klin. Wschr. 11, 637 (1966)
- 23.) KREYSZIG, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Vandenhoeck & Ruprecht Verlag, Göttingen 1967
- 24.) LAMBERS, K.:
Cytochemische Untersuchungen an Blutzellen und
ihre Bedeutung für die Klinik der Blutkrankheiten.
Int. 1, 269 (1960)
- 25.) LENNERT, K., LÖFFLER, H., LEDER, L. D.:
Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymph-
knotens.
I. Alkalische Phosphatase in Schnitt und Aus-
strich.
Virchows Arch. p-ath. Anat. 334, 399 (1961)
- 26.) LÖFFLER, H., KLEIN, U. E., LEUCKFELD, E.:
Isoenzymuntersuchungen an normalen und leukämischen
Leukocyten.
Proc. 10th Congr. Europ. Soc. Haemat. Strasbourg 1965,
part II, pp. 632, 639
Karger, Basel/New York 1967
- 27.) MAJUNDAR, C., TSUKADA, K., LIEBERMANN, I.:
Liver protein synthesis after partiel hepatectomy
and acute stress.
J. biol. Chem. 242, 700 (1967)
- 28.) MERKER, H., HEILMEYER, L.:
Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukocyten.
Dtsch. Med. Wschr. 85, 253 (1960)

- 29.) MERKER, H.:
Die alkalische Leukocytenphosphatase-ihre
hämatologische und allgemein-klinische Be-
deutung.
Dtsch. Med. Wschr. 90, 484 (1965)
- 30.) MÜLLER, D.:
Die Aktivität der alkalischen Leukocyten-
phosphatase unter zytostatischer Stoßtherapie
beim Malignomkranken.
Med. Klin. 59, 7 (1964)
- 31.) OEHLERT, W., KLIETMANN, W.:
Die Hemmung der Ribonucleinsäuresynthese durch
Actinomycin und ihre Erholung in verschiedenen
Zellarten der Maus.
Beiträge zur path. Anat. 136, 18 (1967)
- 32.) PLENERT, W.:
Methodische Studien zur Zytochemie der Leuko-
cytenphosphatase:
II. Der Einfluß einiger Hemmstoffe und ver-
schiedener organischer Verbindungen auf die
Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase.
Histochem. 1, 178 (1959)
- 33.) PLENERT, W.:
Studie zur Zytochemie der Leukocytenphosphatase
im Kindesalter:
I. Die alkalische Granulocytenphosphatase
- Methodische Grundlagen und Normalwerte. -
Folia haemat. 79, 273 (1962)
- 34.) PLENERT, W.:
III. Beeinflussung der alkalischen Leukocytenphosphatase-
Aktivität durch Steroidpräparate.
Folia haemat. 80, 52 (1963)
- 35.) RICHTERICH, R., GAUTIER, E.:
Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium:
IV. Bestimmung der alkalischen Phosphatase.
Schweizer Med. Wschr. 92, 781 (1962)
- 36.) ROSEN, R. B., TEPLITZ, R. L.:
Chronic granulocytic leukemia complicated by
ulcerative Colitis: elevated leukocyte alkaline
phosphatase and possible modifier gen deletion.
Blood 26, 148 (1965)

- 37.) SCHIEBLER, T. H., PILGRIM, Ch.:
Zur Regulation der Chemodifferenzierung der Niere.
II. Wirkung von Actinomycin und Cycloheximide auf die alkalische und saure Phosphatase während der Entwicklung.
Histochem. 14, 17 (1968)
- 38.) SMITHIES, G.:
Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61, 629 (1955)
- 39.) SPICER, S. S., HARDIN, J. H.:
Ultrastructure, cytochemistry and function of neutrophil leukocyte granules.
Laborat. Invest. 20, 488 (1969)
- 40.) SZIRMAI, E.:
"Nuclear Haematology"
Acad. Press, New York and London, 1965
- 41.) THIEL, N., L'AGE-STEHR, J., WACKER, A.:
Untersuchungen über den Einfluß von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf die Bildung von Antikörpern.
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 348, 1407 (1967)
- 42.) THORELL, B.:
Studies on the formation of cellular substances during blood cell production.
London: H. Kimpton, 1947
- 43.) TRUBOWITZ, S., FELDMAN, D., MORGENSTERN, S. W., HUNT, V. M.:
The isolation, purification and some properties of the alkaline phosphatase of the human leukocytes.
Biochem. J. 80, 369 (1961)
- 44.) TRUBOWITZ, S., KIRMAN, D., MASEK, B.:
The leukocyte alkaline phosphatase in mongolism.
Lancet 2, 486 (1962)
- 45.) TRUBOWITZ, S., FELDMAN, D., BENANTE, C., HUNT, V. R.:
The alkaline phosphatase content of the human polymorphonuclear leukocyte in blood and marrow.
Amer. J. Clin. Path. 31, 481 (1959)
- 46.) WACHSTEIN, M.:
Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal blood and marrow cells.
J. Lab. & Clin. Med. 31, 1 (1946)

- 47.) WALKER, R. L., HERION, J. C., PALMER, J. G.:
Leukocyte kinetics studied by nitrogen mustard
induced alterations in DNA phosphorus labeling.
Blood 20, 72 (1962)
- 48.) WEISKOTTEN, H. G.:
Amer. J. Path. 6, 183 (1930). Cit. n. G. BECHER,
H. V. FOERSTER u. E. P. CRONKITE, S. 188
in H. Braunsteiner: Physiologie und Physio-
pathologie der weißen Blutzellen.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1959
- 49.) WEISSEL, M., LOHMANN, D.:
Der Einfluß des Blutplasmas auf die alkalische
Leukocytenphosphatase.
Zschr. f. d. ges. Innere Medizin u. ihre
Grenzgebiete 19, 397 (1964)
- 50.) WESTHUES, M., FRITSCH, R.:
Die Narkose der Tiere.
Band II, Allgemeinnarkose
Verlag Paul Parey, 74 ff, 1961
- 51.) YOUNG, Ch. W.:
Actinomycin and antitumor antibiotics.
Amer. J. of Clin. Pathol. 52, 130 (1969)

Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. Löffler

danke ich für die Überlassung des Themas, für
seine wertvollen Anregungen und die freundliche
Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Fräulein Irmgard Schäfer und Frau Edeltraud Trinkaus

danke ich für die freundliche Unterstützung und
Einführung in die Labortechnik.

Frau Erb

danke ich für die sorgfältige Anfertigung der
Fotoarbeiten.

Lebenslauf

Am 18. 11. 1943 wurde ich als Sohn des Studiendirektors Dr. Reinhold Weber und seiner Ehefrau Gerda, geborene Hahn, in Weilburg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1950 bis 1954 in Aumenau wechselte ich auf das Gymnasium Philippinum in Weilburg über, um 1963 mein Abitur im altsprachlichen Zweig abzulegen.

Anschließend immatrikulierte ich mich an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Nach vier Semestern Physik und Mathematik begann ich im Sommersemester 1965 mit meinem Medizinstudium. Im Frühjahr 1966 legte ich meine naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und im Herbst 1967 bestand ich meine ärztliche Vorprüfung. Im Januar 1971 bestand ich mein medizinisches Staatsexamen.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449